

Agradecimentos

O maior desafio da elaboração desta Tese foi conseguir colocar em palavras os devidos agradecimentos a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a cumprir os meus objetivos e mais uma etapa da minha formação académica.

Ao coordenador de mestrado em Genética Forense, Professor Catedrático António Manuel Amorim dos Santos, agradeço a oportunidade e o privilégio de frequentar este Mestrado que em muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Ao I3S, em especial à Doutora Luísa Azevedo, ao Doutor Luís Fernandez e toda a equipa de sequenciação de amostras por todo o apoio, incentivo e ajuda que me forneceram no decorrer deste projeto.

Ao Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge no Porto, em especial à Doutora Laura Vilarinho por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese e por permitir a minha integração num centro de investigação de tão elevada qualidade e exigência. Agradeço também a sua simpatia, disponibilidade, exigência e confiança que depositou sempre em mim.

À Doutora Célia Nogueira e Dra. Altina Lopes, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Reconheço também, com gratidão, não só a confiança que depositaram em mim, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiram, assim como todos os estímulos e desafios na realização de todas as fases do projeto. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela sincera amizade, pela total disponibilidade que tiveram sempre comigo e claro a boa disposição em todos os momentos. O vosso apoio foi determinante na elaboração desta tese e a vossa sabedoria foi essencial para que chegasse ao fim deste trabalho com um enorme sentimento de satisfação.

Aos meus colegas de laboratório um muito obrigada pela vossa amizade, alegria, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta tese e também permitiram que cada dia fosse encarado com motivação e alegria. Agradeço também todos os bons momentos que passei dentro e fora do laboratório.

A todos os meus amigos pelos intermináveis desabafos ao telemóvel, pela partilha dos bons (e menos bons) momentos e principalmente por estarem sempre a apoiar-me e do meu lado mesmo quando eu menos merecia.

À minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, um enorme obrigada por me deixarem perseguir o meu sonho, lutar por aquilo que acredito e por

acreditarem em mim e me deixarem finalizar mais um capítulo na minha vida académica. Muito obrigada sem vocês não teria conseguido.



Resumo

A rabdomiólise resulta da lise do músculo esquelético, devido à lesão no tecido muscular com consequente libertação de componentes intracelulares do músculo para a corrente sanguínea, que leva a mioglobínúria e, nos casos mais graves, falência renal aguda. Esta síndrome em adultos é normalmente causada por trauma, intoxicação ou infeção, enquanto em crianças está mais relacionada com causas genéticas. As crises de rabdomiólise podem estar associadas a alterações no metabolismo da lipina causadas por mutações no gene *LPIN1* e começam frequentemente antes dos 6 anos de idade. Esta doença é autossómica recessiva e na maioria dos casos é desencadeada por febre, atividade física intensa, jejum e anestesia. Os doentes heterozigóticos podem também apresentar sintomas de câimbras e mialgias induzidas pelo esforço. O gene *LPIN1* é constituído por 19 exões e codifica a proteína lipin-1 que tem atividade fosfatase ácida fosfatídica (PAP1). A lipin-1 é também co-ativador dos fatores que controlam a transcrição de genes da oxidação dos ácidos gordos e da cadeia respiratória mitocondrial (PPAR α , PPAR γ , PGC-1 α , SREBP1 e NFATc4). Quando a lipin-1 se liga ao NFATc4, que é um fator nuclear de ativação das células T, reprime a expressão dos genes inflamatórios. Esta proteína é expressa predominantemente no músculo esquelético e tecido adiposo e é responsável pela maior parte da atividade PAP1 da musculatura esquelética.

Até ao momento, no gene *LPIN1* foram descritas 36 mutações patogénicas, constituindo a segunda causa mais comum de rabdomiólise com início precoce. Neste sentido foi implementado este estudo genético e analisados a nível molecular 20 doentes com Rabdomiólise, tendo sido identificado o primeiro doente português com uma nova mutação no gene *LPIN1*, o que contribuiu para expandir o espectro mutacional deste gene.

Palavras-chave: Rabdomiólise, *LPIN1*, PAP1, mioglobulinúria

Abstract

Rhabdomyolysis results from a damage in skeletal muscle fibres and release of intracellular components of the muscle to the bloodstream, which leads to myoglobinuria, and in severe cases, acute renal failure. This syndrome in adults is usually caused by trauma, intoxication or infection, while in children is related to genetic causes. The crisis of rhabdomyolysis can be associated with changes in gene *LPIN1* and usually begin before 6 years of age. This disorder is autosomal recessive and in most cases is triggered by febrile illness, intense physical activity, fasting and anaesthesia. Heterozygous patients also have symptoms of cramps and muscle pain induced by exercise. The *LPIN1* spans 19 exons and encodes a protein, lipin-1, an enzyme with phosphatidic acid phosphatase activity (PAP1). The lipin-1 is also coactivator of elements that controlling the transcription of genes of fatty acid oxidation and the mitochondrial respiratory chain (PPAR α , PPAR γ , PGC-1 α , SREBP1 and NFATc4). When lipin-1 binds to NFATc4, which is a nuclear factor of activated T cells, suppresses the expression of inflammatory genes. This protein is expressed predominantly in skeletal muscle and adipose tissue and is responsible for most, if not all, of the PAP1 activity of skeletal muscle.

Until now the gene *LPIN1* has 36 pathogenic mutations described in the literature, which have been associated with the second most common cause of early onset rhabdomyolysis. The scope of this study was implemented this genetic study and investigate at a molecular level 20 patients with Rhabdomyolysis. This study allowed the identification of the first *LPIN1* mutation in portuguese patients and contributed to expand the mutational spectrum of this gene.

Keywords: Rhabdomyolysis, *LPIN1*, PAP1, myoglobinuria.

Índice:

Lista de Tabelas	7
Lista de Figuras	8
Lista de Abreviaturas	9
I. Introdução	11
I.1. Fatores Desencadeadores Recorrentes de Rabdomiólise	11
I.2. Causas de Rabdomiólise	11
I.2.1. Causas Traumáticas	13
I.2.2. Causas Não-Traumáticas - Hereditárias	14
I.2.2.1. Alterações no Metabolismo dos Ácidos Gordos	14
I.2.2.2. Alterações no Metabolismo do Glicogénio	15
I.2.2.3. Doenças Mitocondriais	16
I.2.2.4. Doenças na Bomba de Cálcio	16
I.2.2.5. Distrofias Musculares	17
I.2.2.6. Doenças do Metabolismo da Lipina	17
I.2.2.6.1. Proteína Lipin-1	18
I.2.2.6.2. Gene <i>LPIN1</i>	18
II. Objetivos	21
III. Doentes e Métodos	22
III.1 Doentes	22
III.2 Métodos	23
III.2.1. Extração DNA Genómico	23
III.2.2. Quantificação do DNA	23
III.2.3. <i>PCR</i> de Amplificação	23
III.2.4. <i>Long Range PCR</i>	26
III.2.5. Purificação dos Produtos de <i>PCR</i> amplificados	27
III.2.6. <i>PCR</i> de sequenciação (assimétrico)	28
III.2.7. Purificação dos produtos de sequenciação por Sephadex	28
IV. Resultados	30
IV.1. Grandes deleções pesquisadas por <i>Long Range PCR</i>	30
IV.2. Variantes detetadas por sequenciação dos produtos de <i>PCR</i>	31
IV.2.1. Análise das variantes exónicas e respetivas regiões flanqueadoras do gene <i>LPIN1</i>	35
IV.2.1.1. Variante de <i>splicing</i> c.2142-2A>G	35
IV.2.1.2. Variantes não sinónimas	36
IV.2.1.2.1 Variante p.S286del	36

IV.2.1.2.2. Variante p.V494M -----	37
IV.2.1.2.3. Variante p.P610S -----	37
IV.2.1.3. Variantes sinónimas -----	38
IV.2.1.3.1. Variantes p.I140I, p.I184I e p.G750G -----	38
V. Discussão -----	40
VI. Conclusão -----	43
VII. Previsões Futuras -----	44
VIII. Referências Bibliográficas -----	45
VIII.1. <i>Webgrafia</i> -----	46

Lista de Tabelas

• Tabela 1 - Causas de RM -----	12
• Tabela 2 - Dados clínicos dos 20 doentes estudados -----	22
• Tabela 3 - <i>Primers</i> específicos para a amplificação das regiões codificantes (exões) do gene <i>LPIN1</i> -----	24
• Tabela 4 - DNA polimerase utilizada para cada exão do gene <i>LPIN1</i> -----	26
• Tabela 5 - Temperatura de <i>anelling</i> para cada exão do gene <i>LPIN1</i> -----	26
• Tabela 6 - Quantidade de reagentes utilizadas para cada reação de <i>PCR</i> ----	26
• Tabela 7 - Condições do termociclador para cada <i>PCR</i> de Amplificação -----	26
• Tabela 8 - Pares de <i>primers</i> utilizados na pesquisa da grande deleção do gene <i>LPIN1</i> nos 20 doentes estudados -----	27
• Tabela 9 - Condições do termociclador para <i>Long Range PCR</i> , com os <i>primers</i> exónicos -----	27
• Tabela 10 - Condições do termociclador para o <i>PCR</i> normal, com os <i>primers</i> intrónicos -----	27
• Tabela 11 - Condições do termociclador para purificação dos produtos de <i>PCR</i> amplificados -----	27
• Tabela 12 - Quantidade de reagentes usadas para cada reação de <i>PCR</i> de sequenciação -----	28
• Tabela 13 - Condições do termociclador para <i>PCR</i> de sequenciação -----	28
• Tabela 14 - Variantes encontradas no gene <i>LPIN1</i> nos 20 doentes estudados -----	31
• Tabela 15 - Frequência das variantes encontradas no gene <i>LPIN1</i> -----	34

Lista de Figuras

- Figura 1 - Classificação da RM conforme a clínica e parâmetros biológicos – 13
 - Figura 2 - Vias metabólicas envolvidas no metabolismo da Lipin-1 ----- 17
 - Figura 3 - Representação gráfica da proteína lipin-1 ----- 18
 - Figura 4 - Mutações descritas para o *LPIN1* ----- 20
 - Figura 5 - Gel de Agarose a 2% - *Long Range PCR* ----- 30
 - Figura 6 - Gel de Agarose a 2% - *PCR* normal ----- 31
 - Figura 7 - Frequência das variantes em heterozigotia e
homozigotia encontradas nos 20 doentes estudados ----- 35
 - Figura 8 - Mutação de *splicing* c.2142-2A>G ----- 36
 - Figura 9 - Alteração c.856_858delTCT/ p.S286del em heterozigotia ----- 36
 - Figura 10 - Alteração c.1480 G>A / p.V494M em heterozigotia ----- 37
 - Figura 11 - Estrutura química dos aminoácidos valina e metionina ----- 37
 - Figura 12 - Alteração c.1828 C>T / p.P610S em heterozigotia ----- 38
 - Figura 13 - Estrutura química dos aminoácidos prolina e serina ----- 38
 - Figura 14 - Alteração c.420C>T - p.I140I em heterozigotia ----- 38
 - Figura 15 - Alteração c.552C>T - p.I184I em heterozigotia ----- 39
 - Figura 16 – Alteração c.2250G>C - p.G750G em heterozigotia ----- 39
-

Lista de Abreviaturas

ALDOA – gene Aldolase A
ASP – ácido aspártico
ATP – adenosina trifosfato
ATPases – adenosina trifosfatases
Ca²⁺ – iões cálcio
c.DNA – ácido desoxirribonucleico complementar
CK – creatina-quinase
CPTI – carnitina palmitoiltransferase I
CPTII – carnitina palmitoiltransferase II
del - deleção
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTPS – desoxirribonucleótidos trifosfatados
FAO – oxidação dos ácidos gordos
g.DNA – ácido desoxirribonucleico genómico
GSD – glicogenose
Ile – Isoleucina
LCHAD – cadeia longa 3-hidroxilacilcolina desidrogenase
Leu – leucina
Met – metionina
Mg²⁺ – iões magnésio
mTORC1 – complexo 1 de rapamicina
NFATc4 – factor nuclear de activação de células T
nm – nanómetro
p. – proteína
Pro – prolina
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia de polimerase
PAP1 – fosfatase ácida fosfatídica 1
PPAR α – recetor de peroxisoma proliferator-activado α
PPAR γ – recetor de peroxisoma proliferator-activado γ
PGC-1 α – recetor de peroxisoma proliferator coactivador α
RM – rabdomiólise
RyR1 – recetor de rianodina tipo 1
Ser – serina
SREBP1 – elemento regulador de esteroide de ligação proteica 1

Thr – treonina

U/L – unidade por litro

V – Valina

X – codão STOP

I. Introdução

A Rabdomiólise (RM) é uma síndrome clínico-laboratorial que decorre da lise das células musculares esqueléticas causando mioglobinúria (Bagley *et al*, 2007) e consequente libertação de eletrólitos e enzimas sarcoplasmáticas, tais como a creatina quinase (CK), a aspartato aminotransferase e a alanina transaminase para a corrente sanguínea, devido à ativação de várias cascatas de sinalização dependentes de iões cálcio (Ca^{2+}). Nestas situações a concentração dos iões Ca^{2+} está onze vezes superior ao normal (Jaradat *et al*, 2016), originando a morte celular devido à ativação de mecanismos prejudiciais tais como a ativação enzimática e contração prolongada das fibras musculares (Scalco *et al*, 2015).

Inicialmente esta síndrome foi descrita na literatura como doença de Meyer Betz (Glyne *et al*, 2002) e era caracterizada por três sintomas dor, fraqueza muscular e urina castanha (Rosa *et al*, 2005).

A RM em 75% dos casos ocorre por causas adquiridas (Jaradat *et al*, 2016), ou seja por problemas metabólicos entre o consumo de energia e a sua produção (Bagley *et al*, 2007).

Esta patologia pode causar insuficiência renal aguda em 4% a 33% dos doentes, arritmias cardíacas e coagulopatia intravascular disseminada (Bagley *et al*, 2007).

I.1. Fatores Desencadeadores Recorrentes de Rabdomiólise

O que desencadeia mais frequentemente a RM são, episódios febris, infeções, esforço e exercício físico intenso, jejum prolongado, anestésicos, drogas e álcool. Estes fatores estão associados ao aumento da temperatura corporal e dos níveis de mediadores circulantes pro-inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas. O jejum prolongado é um fator desencadeador comum nos casos de defeitos da oxidação dos ácidos gordos (FAO) e de mutações no gene *LPIN1* (Hamel *et al*, 2015).

I.2. Causas de Rabdomiólise

A RM está associada a várias causas tais como: lesões, atividade muscular excessiva, aumento da temperatura corporal, hipoperfusão muscular, causas tóxicas e farmacológicas, alterações eletrolíticas e endócrinas, infeções e causas hereditárias (Rosa *et al*, 2005). No entanto, os mecanismos exatos responsáveis por todas as causas de RM ainda não estão bem esclarecidos (Bagley *et al*, 2007).

Tabela 1 – Causas de RM, adaptado de Scalco *et al*, 2015.

<p>Traumáticas Adquiridas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Drogas/Toxinas • Abuso de álcool (etanol) • Infecção/ Sepsis • Esforço físico extremo • Lesão por esmagamento/Síndrome Compartimental • Isquémia • Perturbação Metabólica • Doenças neurológicas primárias • Idiopática • Hipertermia Maligna • Distrofias musculares • Canalopatias Musculares • Anestésicos
<p>Não-Traumáticas Hereditárias</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Alterações no metabolismo dos ácidos gordos (défices de: VLCAD, CPTI, CPTII) • Alterações no metabolismo do glicogénio - Glicogenoses (tipo V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV) • Doenças Mitocondriais • Doenças na bomba de cálcio (gene <i>RYS1</i>) • Distrofias Musculares e Miopatias • Doenças do metabolismo da Lipina (gene <i>LPIN1</i>)

As causas podem-se dividir em traumáticas (adquiridas) e não-traumáticas (hereditárias), ocorrendo estas últimas cinco vezes mais que as traumáticas (Bagley *et al*, 2007) (Tabela 1). Independentemente da causa esta patologia segue uma via comum, quer por lesão direta das fibras do músculo esquelético (causa adquirida), quer por deficiência na produção de energia (causas hereditárias), levando ambas à necrose das fibras musculares (Hamel *et al*, 2015), assim sendo a clínica de RM é composta por quatro sintomas mais relevantes: mialgia, fraqueza muscular, mioglobínúria e falência renal. A clínica e os parâmetros biológicos permitem a classificação da RM, tal como é explicado na Figura 1 (Hamel *et al*, 2015).

Em caso de não se realizar o tratamento desta doença pode ocorrer morte por disfunção renal, cardíaca e hematológica (Schweitzer *et al*, 2015). O tratamento consiste essencialmente em administrar por meio intravenoso, após os primeiros sintomas, uma solução altamente concentrada em glucose (Pichler *et al*, 2015) e depois uma hidratação intravenosa com a administração de soro fisiológico (1,5L/h) (Rosa *et al*, 2005) e por fim, alcalinização da urina para minimizar a precipitação de mioglobina nos rins (Antons *et al*, 2006). Assim o diagnóstico e terapêutica precoce da RM são fundamentais para evitar a progressão da doença (Rosa *et al*, 2005).

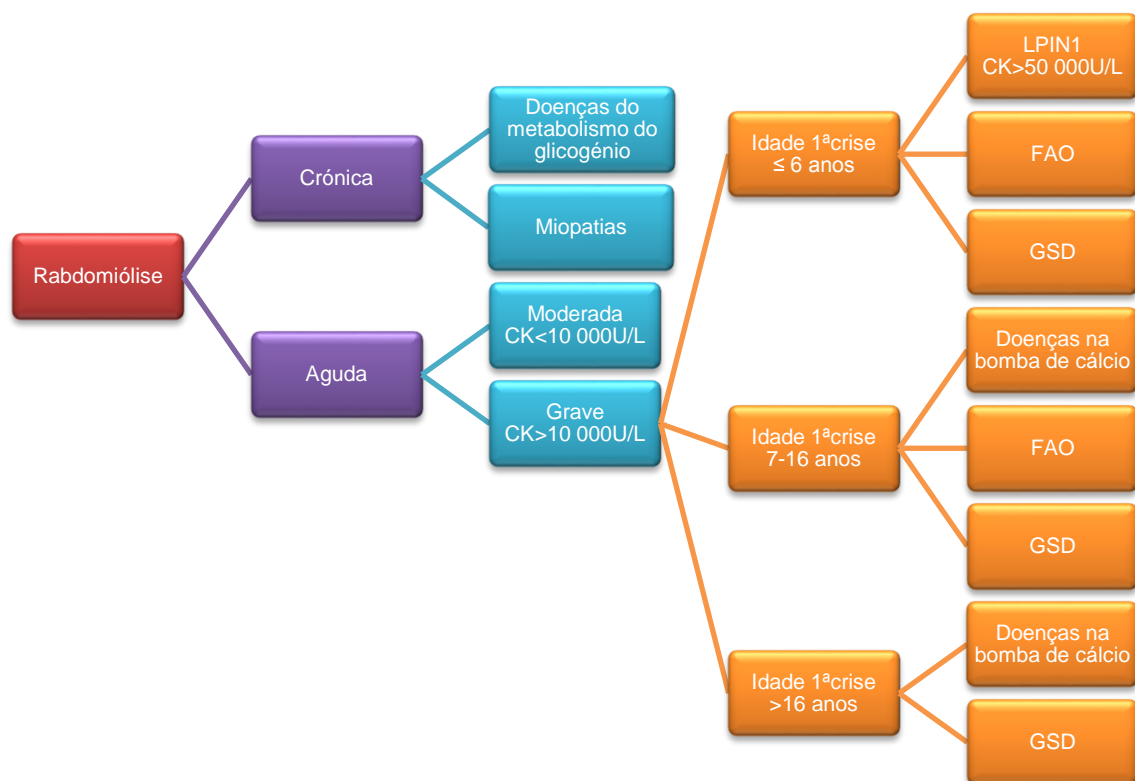


Figura 1 - Classificação da RM conforme a clínica e parâmetros biológicos, adaptado de Hamel *et al*, 2015.

Legenda: FAO – Defeitos na β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos; GSD- Glicogenoses

I.2.1. Causas Traumáticas

A RM originada por causas traumáticas normalmente é devido a um evento isolado associado a, um forte trauma, como agressão física, acidente de viação, ou lesões por esmagamento como é o caso da lesão eléctrica de alta tensão e extensas queimaduras de terceiro grau (Khan, 2009). O trauma mecânico está associado à rutura física das fibras musculares e é um processo isquémico, devido à obstrução da circulação muscular. Esta compressão muscular pode também resultar de uma imobilização prolongada, devido a: depressão do estado de consciência; intervenções cirúrgicas que impliquem a mesma posição por períodos longos de tempo e patologias ortopédicas (Rosa *et al*, 2005). Quando a RM ocorre por compressão muscular aguda, esta só é atenuada quando o músculo necrótico é libertado na circulação (lesão por esmagamento, acidente de viação). No caso da lesão eléctrica por alta tensão ou extensas queimaduras de terceiro grau, a RM ocorre por lesão direta das miofibrilhas musculares (Khan, 2009).

I.2.2. Causas Não-Traumáticas - Hereditárias

As causas que afetam o músculo esquelético são raras e podem ser divididas em perturbações causadas por alterações na FAO, anormal armazenamento de glicogénio, doenças mitocondriais, doenças na bomba de cálcio, distrofias musculares e miopatias e doenças no metabolismo da lipina. A RM é um dos sintomas das doenças lipídicas metabólicas por ser normalmente causada por defeitos na FAO (Jaradat *et al*, 2016).

I.2.2.1. Alterações no Metabolismo dos Ácidos Gordos

Os lípidos são uma fonte de energia importante para o músculo esquelético. Existem muitas enzimas envolvidas na quebra da cadeia longa dos ácidos gordos, podendo os defeitos na FAO provocar intolerância ao exercício, dores musculares e episódios de RM relacionados com exercício aeróbio prolongado, febre, jejum prolongado, *stress*, drogas e anestésicos (Scalco *et al*, 2015).

As seguintes patologias são exemplos de alterações no metabolismo dos ácidos gordos: i) a deficiência 3-Hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD) é uma doença autossómica recessiva associada a mutações no gene *HADHA*, caracterizada por cardiomiopatia de início precoce, hipoglicémia, neuropatia, retinopatia pigmentar e morte súbita (OMIM *609016); ii) a deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeias muito longas (VLCAD) é uma patologia inata da oxidação mitocondrial de ácidos gordos de cadeia longa, com padrão de hereditariedade autossómica recessiva apresentando os doentes mutações no gene *ACADVL*. Os sintomas desta deficiência normalmente aparecem durante a infância, e são hipoglicémia, falta de energia e fraqueza muscular, sendo desencadeados por períodos de jejum, doença e exercício físico. Os indivíduos afetados correm o risco do aparecimento de alterações hepáticas e cardíacas, no entanto quando os sintomas têm início na adolescência ou na idade adulta são mais leves e não afetam o coração; iii) a deficiência na Carnitina Palmitoiltransferase II (CPTII), enzima mitocondrial essencial na FAO, uma vez que permite converter a gordura em energia, pois tem como função retirar a carnitina que está ligada aos ácidos gordos para entrar na mitocôndria. Os ácidos gordos são a fonte principal de energia para o coração e músculos. Durante os períodos de jejum, são também importantes para o fígado e outros tecidos. Existem três tipos de deficiência de CPT II: a) a forma letal neonatal; b) a forma hepatocardiomuscular infantil grave e c) a forma miopática. Esta patologia é autossómica recessiva associada a mutações no gene *CPT2*, e no caso das crianças com clínica hepatocardiomuscular grave ocorre o risco de insuficiência hepática,

alterações no sistema nervoso, coma e morte súbita. A forma miopática associada a esta patologia tem episódios recorrentes de dores musculares (mialgia), fraqueza muscular e RM. O primeiro episódio normalmente ocorre durante a infância ou adolescência, embora a maioria dos doentes com a deficiência CPT II na forma miopática não apresente sinais ou sintomas da doença fora das crises de mialgia ou RM (2).

I.2.2.2. Alterações no Metabolismo do Glicogénio

O metabolismo do glicogénio constitui uma importante fonte de energia para o músculo-esquelético que provém do exercício anaeróbio, glicólise aeróbia e esforço extremo. Defeitos genéticos podem levar à ausência ou à deficiência grave das enzimas envolvidos neste metabolismo o que pode originar alterações na quebra do glicogénio, resultando na intolerância ao exercício e RM (Scalco *et al*, 2015). As deficiências enzimáticas envolvidas nas vias metabólicas do glicogénio podem causar defeitos metabólicos no catabolismo ou anabolismo deste polissacarídeo, originando doenças genéticas do armazenamento de glicogénio, também denominadas Glicogenoses. A maioria destas doenças são autossómicas recessivas e diferenciam-se pelo efeito enzimático associado, ao órgão que afetam, à idade em que ocorrem as primeiras manifestações da doença e à severidade dos sintomas (Carlos *et al*, 2014). As Glicogenoses musculares são: tipo V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, assim estes casos o diagnóstico é confirmado por estudo molecular (Scalco *et al*, 2015).

I.2.2.3. Doenças Mitocondriais

As mitocôndrias são organelos muito dinâmicos que fornecem às células energia na forma de ATP, por fosforilação oxidativa (OXPHOS). Os defeitos da OXPHOS podem afetar qualquer órgão ou tecido do organismo, sendo o músculo-esquelético, o músculo cardíaco e o sistema nervoso central os mais afetados devido à elevada dependência do metabolismo energético. Assim se compreende que as formas de apresentação mais frequentes incluam o quadro miopático, cardíaco e encefalomiopático. A apresentação clínica destas alterações é extremamente variável, pois existem várias causas genéticas envolvidas, e embora a RM seja uma manifestação invulgar, pode estar associada a estas doenças. Nestas patologias os desencadeadores de RM são exercício/atividade física e doenças virais (Scalco *et al*, 2015).

I.2.2.4. Doenças na Bomba de Cálcio

A bomba de cálcio permite a tradução eficaz de um impulso neurológico elétrico numa contração muscular. Trata-se de um processo complexo que envolve vários canais iónicos intramusculares e bombas, em que os principais compostos são: o recetor dihidropinidina regulado por voltagem, localizado nos túbulos transversais, o recetor de Rianodina tipo 1 (RyR1) do músculo-esquelético regulado por um ligante e localizado no retículo sarcoplasmático e vários retículos sarcoendoplasmáticos de cálcio transportadores de ATPases (Scalco *et al.*, 2015). O RyR1 é o maior canal iónico conhecido e é o que liberta iões Ca^{2+} para o músculo-esquelético, sendo essencial na sua ativação contrátil. A função deste recetor é controlada por um canal de cálcio controlado por voltagem (Cav1.1) e que funciona durante a atividade de contração do músculo. Devido ao papel fundamental do RyR1 na contração-extensão da musculatura esquelética, mutações neste recetor resultam numa desregulação dos iões Ca^{2+} e são por isso a causa mais comum de doenças neuromusculares e miopatias graves hereditárias no músculo-esquelético, podendo apresentar episódios de RM. Estas miopatias constituem um grupo heterogéneo de doenças de fraqueza muscular causadas por mutações ou disfunções em diferentes componentes deste mecanismo (Hernández-Ochoa *et al.*, 2016; Scalco *et al.*, 2015).

Os fatores desencadeadores de RM nestes casos são temperaturas elevadas, anestésicos, relaxantes musculares, drogas, álcool e exercício físico, sendo este último o mais comum. No entanto, nestes casos os episódios de RM podem surgir algumas horas ou dias após o exercício físico intenso e ocasional (Scalco *et al.*, 2015).

I.2.2.5. Distrofias Musculares

Trata-se de um grupo de patologias clínicas geneticamente heterogéneo, caracterizado essencialmente por fraqueza muscular progressiva, degradação do músculo-esquelético e mioglobínúria. Nestes casos a lesão muscular e RM estão associados ao esforço mas a relação do aparecimento dos sintomas com a duração do exercício ainda é pouco esclarecedora (Scalco *et al.*, 2015).

I.2.2.6. Doenças do Metabolismo da Lipina

A RM em adultos é normalmente causada por trauma, intoxicação ou infeção, enquanto nas crianças é frequentemente por causa de doenças musculares hereditárias, no entanto podem ocorrer estas alterações em adultos. As duas causas mais comuns de RM precoce grave recorrente em crianças são as doenças da FAO e alterações no metabolismo da lipina (Figura 2) (Meijer *et al.*, 2015).

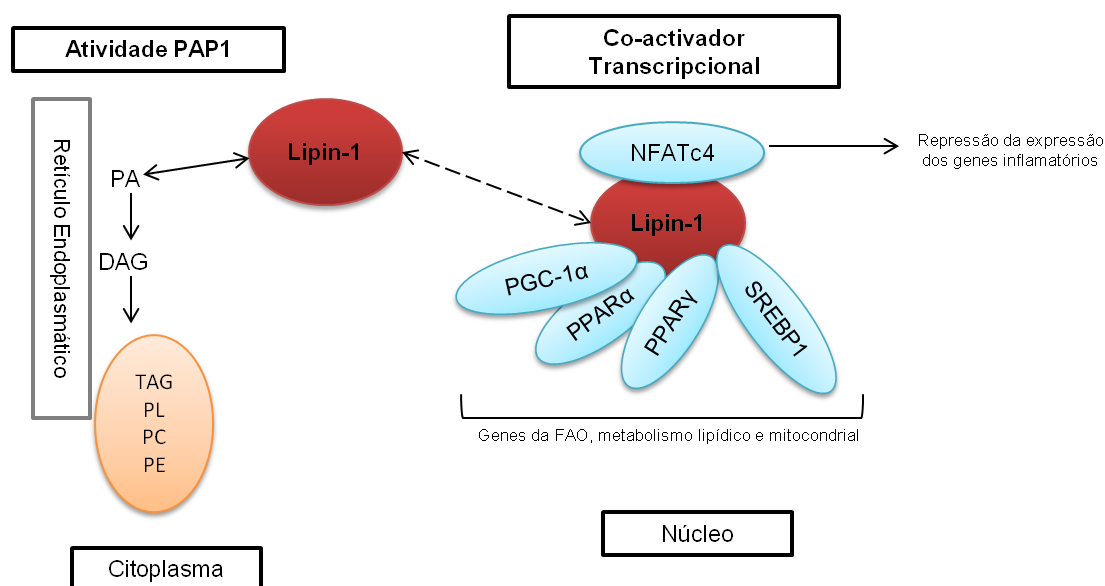


Figura 2 – Vias metabólicas envolvidas no metabolismo da Lipin-1, adaptado de Reu *et al*, 2008.

Legenda: A lipin-1 atua tanto como uma fosfatase ácida fosfatídica como co-ativador transcricional. No lado esquerdo, citoplasma, a lipin-1 atua como fosfatase ácida fosfatídica (Atividade PAP1), catalisando a desfosforilação do ácido fosfatídico (PA) em diacilglicerol (DAG), que é um precursor comum na síntese de triacilgliceróis (TAG), fosfolípidos (PL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE). No lado direito, núcleo, a lipin-1, atua como co-ativador transcricional juntamente com os fatores PGC-1α, PPARα, PPARγ, SREBP1 que regulam a expressão génica da FAO, do metabolismo lipídico e da cadeia respiratória mitocondrial. Juntamente com o fator NFATc4 (fator nuclear de ativação de células T) reprime as expressões dos genes inflamatórios.

Este gene foi identificado pela primeira vez em 2008 por Zeharia *et al*, associado a mutações autossómicas recessivas que causam RM grave e recorrente, desencadeada por febre, exercício, anestésicos e jejum prolongado estando associadas à segunda causa mais comum de RM em recém-nascidos (Hamel *et al*, 2015; Scalco *et al*, 2015). As mutações no gene *LPIN1* originam deficiências na energia celular e são a causa de mais de 50% dos episódios de RM vistos em doentes pediátricos (Pichler *et al*, 2015).

Os mecanismos patogénicos que podem levar à RM neste tipo de doença estão relacionados com alterações na síntese lipídica de triglicéridos e membrana fosfolipídica assim como defeitos energéticos (Scalco *et al*, 2015).

As crianças com estas alterações normalmente têm a sua primeira crise antes dos seis anos e apresentam níveis de CK no sangue superiores a 10 000U/L. No entanto, fora das crises a maior parte apresenta função física e clínica normais, e os níveis de CK normais ou ligeiramente elevados (acima de 700U/L) (Pichler *et al*, 2015). Na biópsia muscular é comum aparecerem gotículas lipídicas, deficiência do citocromo c oxidase e fibras rotas e vermelhas, no entanto é necessário o estudo molecular para confirmar o diagnóstico (Pichler *et al*, 2015; Scalco *et al*, 2015). É de salientar que cerca de 1/3 dos pacientes morre durante as crises (Pichler *et al*, 2015).

I.2.2.6.1 Proteína Lipin-1

Esta proteína tem 890 aminoácidos e dois domínios muito conservados quer entre as proteínas lipínicas, quer entre as diferentes espécies (Figura 3), são eles: o domínio N-LIP que se encontra na região N-terminal e que corresponde aos primeiros 114 aminoácidos (Michot *et al*, 2010; Jaradat *et al*, 2016) e o domínio C-LIP que se encontra no C-terminal e que corresponde à região compreendida entre os aminoácidos 673 e 830 (Michot *et al*, 2010). Este domínio possui os motivos: i) ASP-X-ASP-X-Thr (DxDxT) catalítico dependente de iões magnésio (Mg^{2+}), que é partilhado entre as enzimas dehalogenases haloácidas e está compreendido entre os aminoácidos 678 e 682, sendo responsável pela atividade fosfatase ácida fosfatídica (PAP1) da enzima, e ii) o motivo Leu-X-X-Ile-Leu (LxxIL) que se encontra entre os aminoácidos 689 e 693 e facilita a formação do complexo com os co-ativadores transcripcionais e os fatores nucleares para induzir a expressão de várias enzimas na FAO mitocondrial e no ciclo do ácido tricarboxílico nos hematócitos (Jaradat *et al*, 2016; Michot *et al*, 2012).

Esta proteína é predominantemente expressa no músculo-esquelético e tecido adiposo e a sua expressão é necessária para a diferenciação e função dos adipócitos (Michot *et al*, 2012). A nível do músculo-esquelético a lipin-1 é responsável pela maior parte da atividade PAP1 (Jaradat *et al*, 2016).

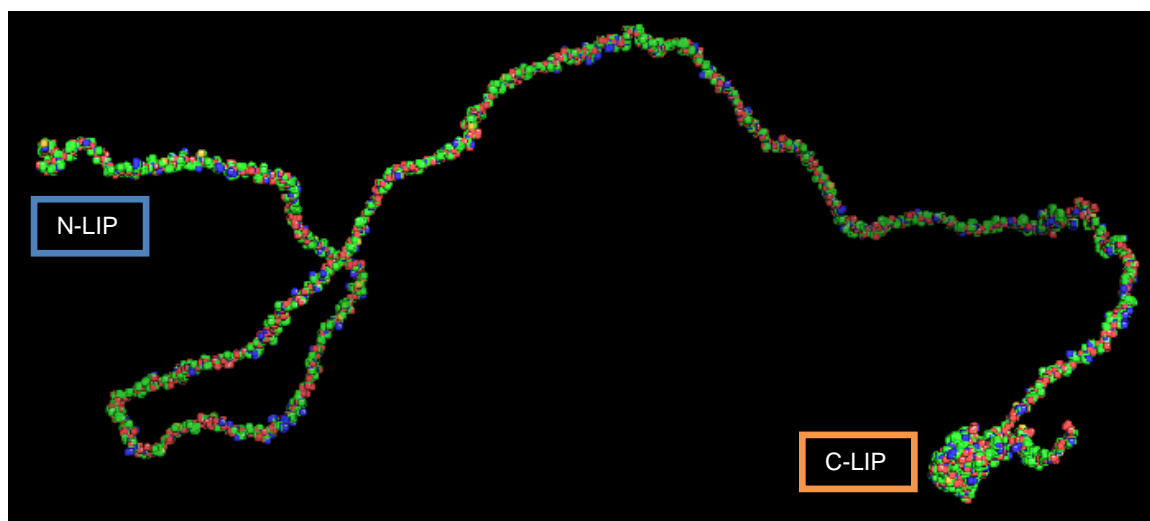


Figura 3 – Representação gráfica da proteína lipin-1, obtida pelo software Pymol.

I.2.2.6.2 O gene *LPIN1*

O gene *LPIN1* possui 5363 pb, distribuídos por 20 exões, das quais 19 são transcritos e localiza-se no cromossoma 2p25.1. Este gene codifica a lipin-1, que é uma enzima que quando se encontra no citoplasma, atua como uma PAP1 que desfosforila o ácido

fosfatídico em diacilglicerol, sendo este um precursor comum na síntese dos triacilgliceróis, fosfolípidos, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. No entanto quando esta enzima se encontra no núcleo funciona como co-ativador da regulação transcripcional, através da interação com fatores de transcrição (PPAR α , PPAR γ , PGC-1 α , SREBP1) que regulam a expressão dos genes envolvidos na FAO, metabolismo lipídico e cadeia respiratória mitocondrial. Esta enzima interage também com um fator nuclear de ativação de células T (NFATc4) para reprimir a expressão dos genes inflamatórios (Hamel *et al*, 2015; Michot *et al*, 2012; Meijer *et al*, 2015; Schweitzer *et al*, 2015). É muito abundante nos adipócitos, fibras do músculo-esquelético, fígado e miocárdio (Michot *et al*, 2010) e é um alvo do mecanismo do complexo I rapamicina (mTORC1), uma vez que a sua localização subcelular e a sua função são reguladas pela fosforilação dependente de mTORC1 em vários locais (Zhang *et al*, 2014).

Este gene, devido ao *splicing* alternativo, possui três isoformas que são a lipin-1 α , β e γ . Estas isoformas são enzimaticamente ativas mas tem diferentes afinidades ao substrato. Assim os homólogos da *LPIN1* nos humanos são a *LPIN2* e *LPIN3*, elas partilham a mesma estrutura organizacional, isto é todos os intrões estão localizados em posições homólogas, no entanto expressam-se em tecidos diferentes (Jaradat *et al*, 2016).

Esta enzima é fundamental na biossíntese lipídica, regulação da expressão génica das enzimas metabólicas lipídicas e hepáticas, em funções metabólicas na adipogénese (Grimsey *et al*, 2008), fosforilação oxidativa e no metabolismo energético dependente dos lípidos (Michot *et al*, 2014), estando associada às patologias: distrofia da gordura no fígado e mioglobínúria grave que leva a RM (OMIM*605518).

As mutações deste gene são identificadas como a causa principal de RM grave recorrente em doentes pediátricos, antes dos 6 anos e com os níveis de CK elevados (> 10 000 U/L). Estas mutações não estão associadas a mialgias sem RM. No entanto as mutações em heterozigotia estão associadas a doentes adultos (Michot *et al*, 2012) que podem apresentar como sintomas, câimbras e mialgia provocadas pelo exercício (Meijer *et al*, 2015). Segundo a HGMD® Professional 2015.4 e Michot *et al*, 2012, estão descritas 36 mutações, 22 *missense/nonsense*, 4 mutações de *splicing*, 6 deleções pequenas, 2 inserções pequenas, 1 deleção/inserção pequena e 1 grande deleção, que funciona como *hotspot* mutacional e que está localizada entre os exões 17 e 19: c.2295-866_2410-30del1763.

Na Figura 4 está representado um esquema de todas as mutações descritas até ao momento neste gene.

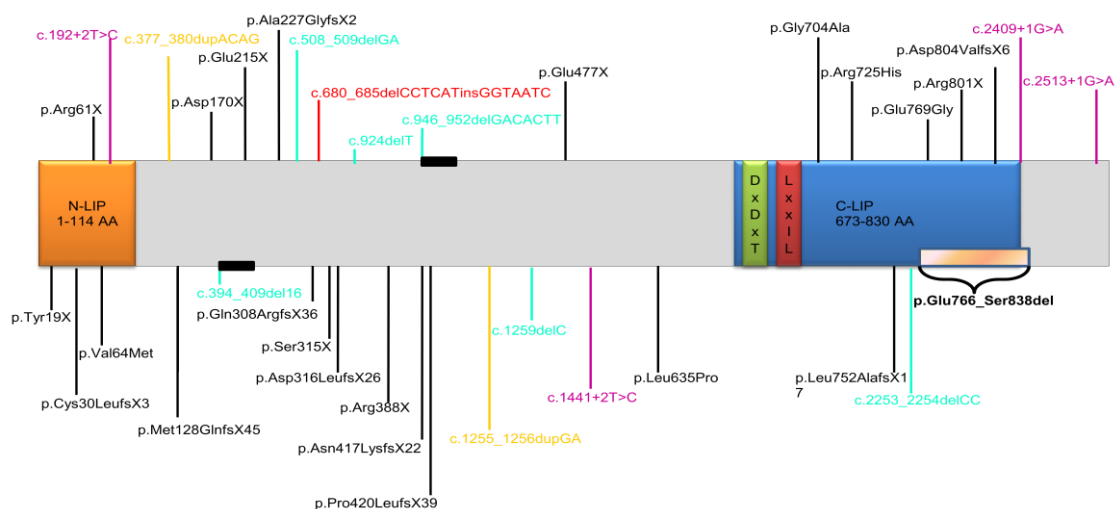


Figura 4 – Mutações descritas no gene *LPIN1*, adaptado de Michot *et al*, 2012 e HGMD® Professional 2015.4.

II. Objetivos

Esta investigação consiste num estudo de doentes com sintomatologia de RM suspeitos de alterações no metabolismo da Lipina. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi implementar o estudo genético do *LPIN1* e investigar a nível molecular, 20 doentes com RM através da pesquisa de alterações no gene *LPIN1* por sequenciação automática de Sanger, seguida da análise dos resultados através do software SeqScape e por *Long Range PCR* para pesquisa de grandes deleções neste gene.

III. Doentes e Métodos

III.1 Doentes

Neste projeto foram estudados 20 doentes provenientes de hospitais de todo o país, sendo na maioria crianças e havendo apenas 7 adultos (Tabela 2). Os principais sintomas clínicos apresentados foram fraqueza muscular, mialgias e RM recorrente. Estes doentes não são consanguíneos e foram despistados para outras causas de RM tais como, as deficiências em VLCAD e CPTII.

Tabela 2 – Dados clínicos dos 20 doentes estudados.

Doente	Idade	Sexo	Fenótipo
1	7 A	M	Episódios recorrentes de RM
2	35 A	F	Fraqueza muscular e sintomas de RM
3	21 A	M	RM mioglobinúrica
4	1 A	M	RM e CK elevado (1800 U/L)
5	1 A	M	RM ligeira, apneia, infeção respiratória, CK elevado
6	19 A	M	Episódios recorrentes de RM
7	11 A	M	Episódios recorrentes de RM
8	37 A	F	Miopatia lipídica
9	15 A	M	RM acentuada pelo exercício e mialgias com CK= 300-800 U/L e CRM normais
10	38 A	M	Miopatia metabólica com sintomas de fadiga, mialgia e câimbras
11	28 A	F	Miopatia e RM
12	14 A	F	Mialgias de esforço e episódios recorrentes de RM
13	2 A	M	RM, ataxia e CK elevado
14	3 A	F	RM, hipoglicemia e CK elevado;
15	16 A	M	Mialgias, enzimas musculares elevadas e CK elevado
16	9 A	M	Episódios de RM despoletados pelo esforço
17	19 A	M	RM
18	6 A	F	RM
19	15 A	M	Episódios recorrentes de RM
20	16 A	M	Lise muscular persistente

Legenda: A- anos; M- masculino; F- feminino; CK- creatina-quinase; CRM-Cadeia Respiratória Mitocondrial.

III.2 Métodos

III.2.1. Extração DNA Genómico

O DNA foi extraído quer de sangue total em EDTA quer de cartão de *Guthrie* usando o equipamento *BioRobot EZ1 (Qiagen)* e os *Kits EZ1 DNA Blood 350µL (Qiagen, Refª 951054)* e *EZ1 DNA Tissue (Qiagen, Refª 953034)*, respetivamente, de acordo com o protocolo do fabricante. Este método é baseado em tecnologia de partículas magnéticas e permite obter um DNA de elevada qualidade. Após a lise na presença de um sal caotrópico (desnaturante) o DNA liga-se à superfície de sílica das partículas magnéticas, que depois serão separadas do lisado por um separador magnético. De seguida ocorre uma lavagem para remover os resíduos contaminantes e por fim a eluição do DNA com um tampão adequado. Os DNAs foram acondicionados em caixas de criopreservação a -20°C.

III.2.2. Quantificação do DNA

Depois de extraído o DNA, foi quantificado num espectrofotómetro (*Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA*). Este aparelho permite determinar a pureza do DNA através da razão entre os valores da absorvência a 260nm e a 280nm, uma vez que a 260nm são detetados os ácidos nucleicos e a 280nm as proteínas. Esta razão deve-se encontrar entre 1,5 e 2,0, no entanto valores superiores a 1,8 podem indicar contaminação por proteínas ou outros contaminantes. Esta técnica serve como controlo de qualidade da extração de DNA.

III.2.3. PCR de Amplificação

A reação em cadeia de polimerase (PCR) permite amplificar uma determinada sequência de DNA através de uma mistura específica composta por água (H₂O), solução tampão, cloreto de magnésio (MgCl₂), desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), oligonucleótidos (*primers*) e DNA polimerase.

Os *primers* devem ser desenhados de acordo com a sequência alvo a ser sintetizada e consiste numa sequência de 16 a 22 nucleótidos complementar às duas extremidades opostas de cada cadeia de DNA alvo (Espreafico et al., 2003; Caruso, 2007). O *primer forward* encontra-se próximo da extremidade 5', com a sequência igual ao DNA molde, enquanto que o *primer reverse* encontra-se próximo da extremidade 3', com a sequência complementar ao DNA molde (3). Para o desenho dos *primers* temos de ter em atenção a temperatura de *melting* (T_m) e a temperatura de *anelling* (T_a). Os dois *primers forward* e *reverse* devem ter uma T_m igual ou muito próxima (menos de 5°C de diferença) para não haver problemas de *anelling*. Esta temperatura depende da

percentagem de Guanina (G) e Citosina (C), do comprimento do *primer* e é calculada através da seguinte equação, $T_m = (4(G+C) + 2(A+T)) ^\circ C$ (Vieira; 9; 10). A T_a é a temperatura ótima da reação do par de *primers*. Esta temperatura é afetada diretamente pela concentração do ião sódio (Na^+) na solução. Normalmente esta temperatura é menos $5^\circ C$ que a menor T_m do par de *primers*. O cálculo para esta temperatura é feito segundo a equação: $T_a = (0,3*(T_m \text{ primer}) + 0,7*(T_m \text{ produto})) - 25$, em que $T_m \text{ primer}$ significa temperatura de *melting* dos *primers* e a $T_m \text{ produto}$ significa temperatura de *melting* do produto de PCR. Quando a T_a é elevada ocorre pouco produto de PCR ou não ocorre *anelling*, no entanto se a T_a é baixa ocorre *anelling* inespecífico (Vieira;3).

O desenho de *primers* foi feito através dos *softwares* *Primer3* (v.0.4.0) e o *FastPCR* (v.4.2). Na Tabela 3 estão representados os *primers* específicos para o gene *LPIN1* juntamente com as sequências universais M13, que são *primers* com 18pb (F:5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' e R:5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') e são previamente adicionados a todos os exões do gene, aquando do desenho dos *primers*, para facilitar mais tarde a técnica do PCR de sequenciação.

Tabela 3 – *Primers* específicos para a amplificação das regiões codificantes (exões) do gene *LPIN1*.

Exão	<i>Primers</i>	Tamanho do exão
2	F- TGTAACGACGGCCAGTcggaaatgagaggagctgaa R- CAGGAAACAGCTATGACCcaggtggcatcaccagagta	201pb
3	F- TGTAACGACGGCCAGTatctgtggagacttggccgt R- CAGGAAACAGCTATGACCtgccgtgttccagataacca	96pb
4	F- TGTAACGACGGCCAGTctggaggcctctggcaaggc R- CAGGAAACAGCTATGACCctgtctgattctggcacagc	308pb
5	F- TGTAACGACGGCCAGTctggaacagatctgggtgtt R – CAGGAAACAGCTATGACCccgtgttttctgtgtccta	126pb
6	F- TGTAACGACGGCCAGTtatttgagccatggagctgg R- CAGGAAACAGCTATGACCtcttcggtccgtggcaga	127pb
7	F- TGTAACGACGGCCAGTaccaggtgattgttgaggct R- CAGGAAACAGCTATGACCgtcacggttcagtttctacc	307pb
8	F- TGTAACGACGGCCAGTctgacttgagccatttgc R- CAGGAAACAGCTATGACCcgcccagctgtcttcaca	94pb
9	F- TGTAACGACGGCCAGTatctgtgctgagatgcag R- CAGGAAACAGCTATGACCtcggtgctatcatctgtgct	191pb

10	F- TGTAACGACGGCCAGTtgtctgcacagttggaatgc R- CAGGAAACAGCTATGACCgaaccctgaccacagtgaag	94pb
11	F- TGTAACGACGGCCAGTctgcctaggggtgatatgga R- CAGGAAACAGCTATGACCccccagattaagctaccca	70pb
12	F- TGTAACGACGGCCAGTtttgacgccattaggttt R- CAGGAAACAGCTATGACCctcatggaaactcagcac	93pb
13	F- TGTAACGACGGCCAGTtgagatcaggaccaccgaa R- CAGGAAACAGCTATGACCgaaaggggctgcaaatac	80pb
14	F- TGTAACGACGGCCAGTgggactcaggagagactgga R- CAGGAAACAGCTATGACCcatgtgctcacaacacagcc	127pb
15	F- TGTAACGACGGCCAGTccagggcagtcactgtt R- CAGGAAACAGCTATGACCagctccaactgcaccagaat	149pb
16	F- TGTAACGACGGCCAGTgcaatgaatctgaaaggat R- CAGGAAACAGCTATGACCgactccactgctaccctga	87pb
17	F- TGTAACGACGGCCAGTgtgccattctccacagaaca R- CAGGAAACAGCTATGACCtattggggcagaagaccagt	143pb
18	F- TGTAACGACGGCCAGTcagctgcctgacacacacta R- CAGGAAACAGCTATGACCcaggctactgcttctgggat	115pb
19	F- TGTAACGACGGCCAGTtactgcaccacttgaggt R- CAGGAAACAGCTATGACCaaaggggaaaaggtacaccgc	104pb
20	F- TGTAACGACGGCCAGTggtctgctccttgaggtgt R- CAGGAAACAGCTATGACCctctgctgcaggccaatga	160pb

Legenda: F- *primer Forward*; R – *primer Reverse*: pb – pares de bases.

As DNA polimerases utilizadas foram: *Master Mix Amplitaq Gold® 360* (Applied Biosystems, ref. 4398876), *Master Mix Kit HotStar®Taq Plus* (Qiagen, ref. 203643, 203645, 203646), *Master Mix EmeraldAmp® MAX HS PCR* (Takara, ref. RR330A) e a *ImmoMix® Red* (Bioline, ref. BIO-25021). Estas taqs são *HotStar* o que significa que necessitam de um pré-aquecimento inicial de 10 minutos, este passo inicial é útil porque elimina inespecificidades, uma vez que a enzima está inativa a temperaturas baixas.

Nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 estão representadas as condições usadas no *PCR* de amplificação dos exões do gene *LPIN1*.

Tabela 4 – DNA polimerases utilizadas para cada exão do gene *LPIN1*.

Exões	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
DNA polimerase	Esm.	Im.	Esm.	HotStar (Qiagen)				Esm.	HotStar (Qiagen)				Esm.	HotStar (Qiagen)				Esm.	

Legenda: Esm. - *Master Mix EmeraldAmp® MAX HS PCR* (Takara, ref. RR330A); Im. - *ImmoMix® Red* (Bioline, ref. BIO-25021); HotStar (Qiagen) - *Master Mix Kit HotStar®Taq Plus* (Qiagen, ref. 203643, 203645, 203646)

Tabela 5 – Temperatura de *anelling* para cada exão do gene *LPIN1*.

Exões	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ta	64°C				62°C	64°C	62°C	64°C				62°C	64°C	62°C					

Legenda: Ta – Temperatura de *anelling*.

Tabela 6 – Quantidade de reagentes utilizadas para cada reação de *PCR*. No caso do exão 3 a quantidade de DNA é diferente.

Mix (Total de 12,5 µL)	
H ₂ O	4,3µL (Exão 3 - 4,1µL)
Taq	6,3µL
Primers F e R (10pmol/µL)	0,3µL+0,3µL
DNA	1,3µL (Exão 3 - 1,5µL)

Legenda: F – *primer Forward*; R – *primer Reverse*; H₂O – água.

Tabela 7 – Condições do termociclador para cada *PCR* de Amplificação, de acordo com a tabela 4 e 5.

95°C	95°C	62°C - 64°C	72°C	72°C	12°C
10'	1'	1'	1'	5'	∞
35 ciclos					

Legenda: (') minutos; (") segundos

A verificação da amplificação dos produtos de *PCR* é efetuada através de uma eletroforese em gel de agarose com concentração de 1% em tampão TAE 1x e com o corante *GelRed* (*Biotium*), com as condições de 125Volts, 400mA, durante 15 minutos.

III.2.4 Long Range PCR

Este método é aplicado à pesquisa de uma grande deleção descrita no gene *LPIN1*, localizada entre os exões 17 e 18. Neste *PCR* utilizamos 2µL de DNA, 12,5µL de *MasterMix Esmerald* (2,5U), 2µL de *primer Forward*, 2µL de *primer Reverse* e 6,5µL de

água. Neste método utilizamos dois pares de *primers* (Tabela 8) e diferentes condições do termociclador necessárias para cada par de *primers* (Tabelas 9 e 10).

Tabela 8 – Pares de *primers* utilizados na pesquisa da grande deleção do gene *LPIN1* nos 20 doentes estudados.

Primers exónicos (região entre o exão 17 e 20)	F- GCTGCTGAGTCCCAGCAGCCTCTTCTCTGC
	R- GTGGTCGACTACTTCACAGAGTCTCACATA
Primers intrónicos (região entre o intrão 17 e 19)	F- TGACTTGTTAACCTTATTAGAGT
	R- AATCCCATTAGCCACCGACTCAG

Legenda: F- primer Forward; R – primer Reverse.

Tabela 9 – Condições do termociclador para Long Range PCR, com os *primers* exónicos.

95°C	94°C	65°C	68°C	72°C	4°C
10'	10''	30''	10'	5'	∞
30 ciclos					

Legenda: (') minutos; (') segundos

Tabela 10 – Condições do termociclador para o PCR normal, com os *primers* intrónicos.

95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	12°C
10'	1'	1'	1'	5'	∞
35 ciclos					

Legenda: (') minutos; (') segundos

A amplificação do DNA é verificada através de uma eletroforese em gel de agarose com concentração de 2% em tampão TAE 1x e com o corante Brometo de Etídio, com as condições de 40Volts, 400mA, durante 3 horas e 30 minutos. Neste gel usamos a *Ladder 1Kb* (20.000pb) (*Thermo Scientific, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, #SM1331*) como marcador de pares de bases.

III.2.5 Purificação dos Produtos de PCR amplificados

Para realizar este procedimento foi utilizada a enzima *ExoSap*, em que se mistura um 1µL da enzima com 2µL do produto de *PCR* amplificado. Na Tabela 11 estão descritas as condições do termociclador para este procedimento.

Tabela 11 – Condições do termociclador para purificação dos produtos de PCR amplificados.

37°C	80°C	12°C
15'	15'	∞

Legenda: (') minutos; (') segundos

III.2.6 PCR de sequenciação

Este PCR é realizado depois da purificação dos produtos de PCR e só utiliza uma cadeia DNA molde para sintetizar a cadeia complementar, sendo assim só usa um dos *primers* utilizados no PCR de amplificação. Assim, o produto acumula linearmente e não exponencialmente. Neste método foi utilizada a mistura comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 2.0 (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-AB-Applied Biosystems – 4336776)* que possui desoxiribonucleótidos trifosfatados marcados com 4 fluorocromos distintos, tampão e DNA polimerase. Os *primers* usados neste PCR são os M13 (*Forward* e *Reverse*) diluídos a 3,2pmol. As condições deste PCR encontram-se descritas nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Quantidades de reagentes usadas para cada reação de PCR de sequenciação.

Mix (Total de 10 µL)	
H ₂ O	5.5µL
Tampão de Sequenciação	0.5µL
Primer F ou R - M13 (3,2pmol/µL)	0.5µL
BigDye	0.5µL
ExoSap+DNA	3µL

Legenda: F- *primer Forward*; R – *primer Reverse*; H₂O – água.

Tabela 13 – Condições do termociclador para PCR de sequenciação.

94°C	94°C	50°C	60°C	4°C
2'	10''	6''	4'	∞
25 ciclos				

Legenda: (') minutos; (') segundos

III.2.7 Purificação dos produtos de sequenciação por Sephadex

O produto de sequenciação foi purificado por cromatografia em colunas, utilizando como meio de filtração o gel de *Sephadex*. Este gel é composto por esferas microscópicas que formam uma rede tridimensional onde ficam retidos os *primers* e nucleótidos não incorporados na reação de PCR, sendo eluído apenas o DNA. Em cada coluna utilizou-se um volume de 750µL de solução de *Sephadex* (6,66g por cada 100ml de água), posteriormente foram centrifugadas a 4400rpm durante 4 minutos. De seguida as amostras foram pipetadas para o centro da coluna e centrifugadas a 4400

rpm durante 4 minutos. Por fim já com o DNA purificado adicionou-se 10µL de formamida e analisou-se no sequenciador automático *3130XL ABI PRISM genetic analyser (Applied Biosystems)*. Após a sequenciação das amostras, os electroferogramas obtidos foram analisados manualmente por comparação com a sequência original ou através do *software SeqScape*.

IV. Resultados

Este projeto incidiu no estudo de um grupo de doentes selecionados com base no fenótipo clínico e pelo facto de já terem sido estudados para outras causas de RM, não tendo sido identificada a respetiva causa molecular. No total foram estudados 20 indivíduos, 6 do sexo feminino e 14 do sexo masculino.

IV.1. Grandes deleções pesquisadas por *Long Range PCR*

Esta técnica foi utilizada para permitir detetar a grande deleção descrita para o gene *LPIN1*. Os valores esperados para os *primers* do exão 17 a 20, seriam no caso normal uma banda de tamanho 9461pb, no caso homozigótico uma banda de 7698pb, uma vez que a deleção possui 1763pb, e no caso heterozigótico duas bandas uma de tamanho 9461pb e outra de 7698pb (Figura 5). Os valores esperados para os *primers* do intrão 17 a 19 são, no caso normal uma banda com tamanho de 2095pb, no caso homozigótico uma banda de tamanho de 332pb e no caso heterozigótico duas bandas de tamanho 2095pb e 332pb (Figura 6).

Neste estudo não se encontrou esta grande deleção em nenhum dos doentes estudados.

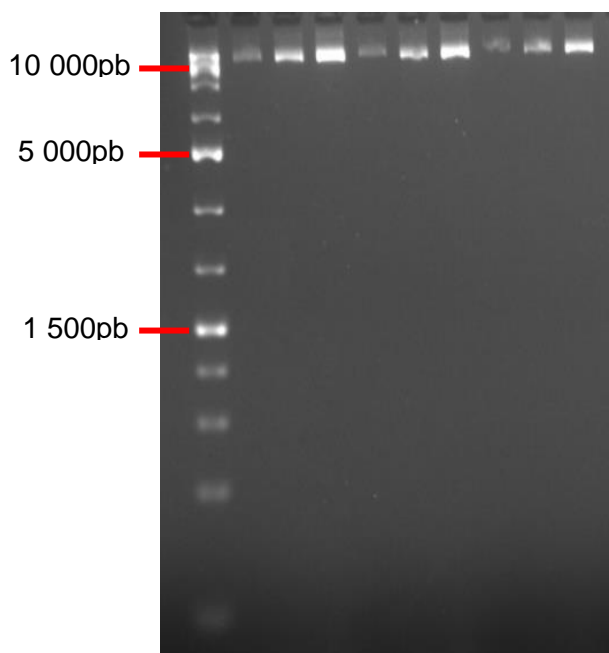


Figura 5 – Gel de Agarose a 2% - *Long Range PCR* - técnica usando as regiões exónicas com as bandas normais de 9461pb e o marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, #SM1331).

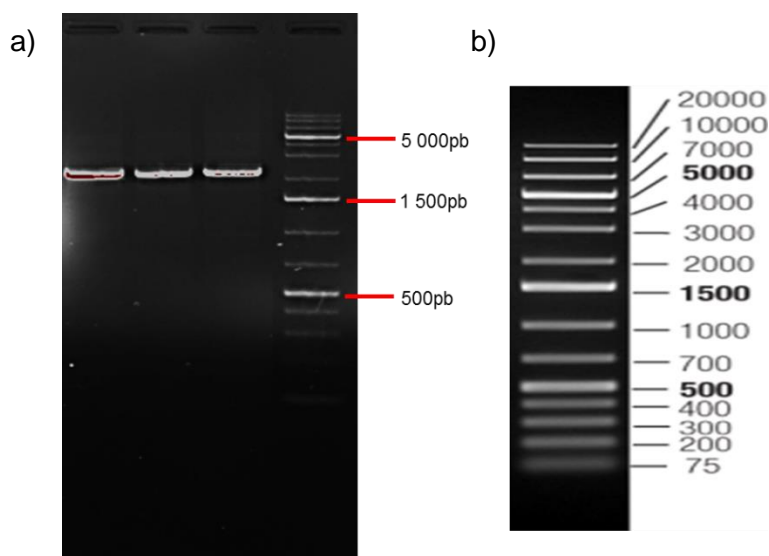


Figura 6 – Gel de Agarose a 2% - PCR normal – a) usando apenas a região intrónica com bandas normais de 2095pb e o b) marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, #SM1331).

IV.2. Variantes detetadas por sequenciação dos produtos de PCR

Esta investigação baseou-se no estudo mutacional por PCR, seguido de sequenciação automática de todos os exões codificantes e respetivas regiões intrónicas flangeadoras do gene *LPIN1*. Assim após o estudo molecular dos 20 doentes selecionados, foram obtidos os resultados descritos na Tabela 14. A variante c.2142-2A>G é referida pela primeira vez neste estudo, enquanto todas as outras estão descritas como *Single Nucleotide Polymorphism* na base de dados do *ensembl* (<http://www.ensembl.org>), embora algumas estejam mencionadas em Jaradat *et al* em 2016 associadas a mutações descritas, como a alteração p.P610S, a c.192+17C>T e a p.I184I associadas à mutação p.Arg725His; a p.G750G associada à mutação p.Arg388X e a c.1698+41G>T associada à mutação p.Glu799Arg. Neste estudo estas mutações não foram encontradas.

Tabela 14 – Variantes encontradas no gene *LPIN1* nos 20 doentes estudados.

Doente	Variantes
1	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1251-62T>C – HT
	c.1698+41G>T – HT
	c.1828C>T - p.P610S – HT
2	c.192+17C>T– HM
	c.1251-62T>C – HT

	c.1606-109_1606-108insT – HT
	c.2054+50delG – HT
	c.2142-2A>G – HT
3	c.-9-14delT – HT
	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
4	c.-9-14delT – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1698+41G>T – HT
5	c.597-19_597-18insT – HT
	c.-9-14delT – HT
	c.192+17C>T – HT
6	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1480G>A - p.V494M – HT
	c.1699-118C>T – HT
7	c.-9-14delT – HT
	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1698+41G>T – HT
	c.2054+50delG – HT
8	c.-9-14delT – HT
	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1250+62C>T – HT
9	c.-9-14delT – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1250+62C>T – HT
	c.1251-62T>C – HT
	c.2054+50delG – HT
	c.*24A>C – HT
10	c.597-19_597-18insT – HT
11	c.-9-14delT – HT
	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1606-109_1606-108insT – HT
	c.1698+41G>T – HT

	c.-9-14delT – HT
	c.420C>T- p.I140I – HT
12	c.597-19_597-18insT – HT
	c.850_852delTCT – p.S286del – HT
	c.2250G>C - p.G750G – HT
13	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1606-109_1606-108insT – HT
14	c.-9-14delT – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
15	c.-9-14delT – HT
	c.552C>T - p.I184I – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1698+41G>T – HT
	c.2054+50delG – HT
16	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1606-109_1606-108insT – HT
17	c.-9-14delT – HM
	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1606-109_1606-108insT – HT
18	c.-9-14delT – HT
	c.192+17C>T – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
19	c.-9-14delT – HM
	c.552C>T - p.I184I – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
20	c.-9-14delT – HM
	c.192+17C>T – HT
	c.552C>T - p.I184I – HT
	c.597-19_597-18insT – HT
	c.1606-109_1606-108insT – HT

Legenda: del- deleção; ins- inserção; c- cDNA; HT- alteração em heterozigotia; HM – alteração em homozigotia

Na Tabela 15 estão representadas as frequências das variantes encontradas nos doentes estudados.

Tabela 15 – Frequência das variantes encontradas no gene *LPIN1*.

Localização c.DNA	g.DNA	Substituição nucleotídica	Varição	Doente	Frequência (%)
c.-9-14	5'UTR	T/-	delT	3;4;6;7;8;9;11;12;14; 15;17;18;19;20	70
c.192+17	intrão 2	C>T	-	2;3;6;7;8;11;13;16;17;18;20	55
c.420	exão 4	C>T	p.I140I	12	5
c.552	exão 4	C>T	p.I184I	15;19;20	15
c.597-19_597- 18	intrão 4	-/T	insT	1:3;4;5;6;7;8;9;10;11;12;13; 14;15;16;17;18;19;20	95
c.856_858	exão 7	TCT/-	p.S286del	12	5
c.1250+62	intrão 8	C>T	-	8;9	10
c.1251-62	intrão 8	T>C	-	1;2;9	15
c.1480	exão 10	G>A	p.V494M	6	5
c.1606- 109_1606-108	intrão 11	-/T	insT	2;11;13;16;17;20	30
c.1698+41	intrão 12	G>T	-	1;4;7;11;15	25
c.1699-118	intrão 12	C>T	-	6	5
c.1828	exão 14	C>T	p.P610S	1	5
c.2054+50	intrão 15	G/-	delG	2;7;9;15	20
c.2142-2	Intrão 16	A>G	-	2	5
c.2250	exão 17	G>C	p.G750G	12	5
c.*24	3'UTR	A>C	-	9	5

Legenda: del- deleção; ins- inserção; c- cDNA; UTR - *UnTranslated Region*

Na Figura 7 estão representadas as frequências das variantes encontradas no gene *LPIN1* no grupo de doentes estudados. Perante este resultado analisamos as variantes exónicas e as que se encontram nas respetivas regiões flanqueadoras, para verificarmos o seu efeito a nível da estrutura proteica.

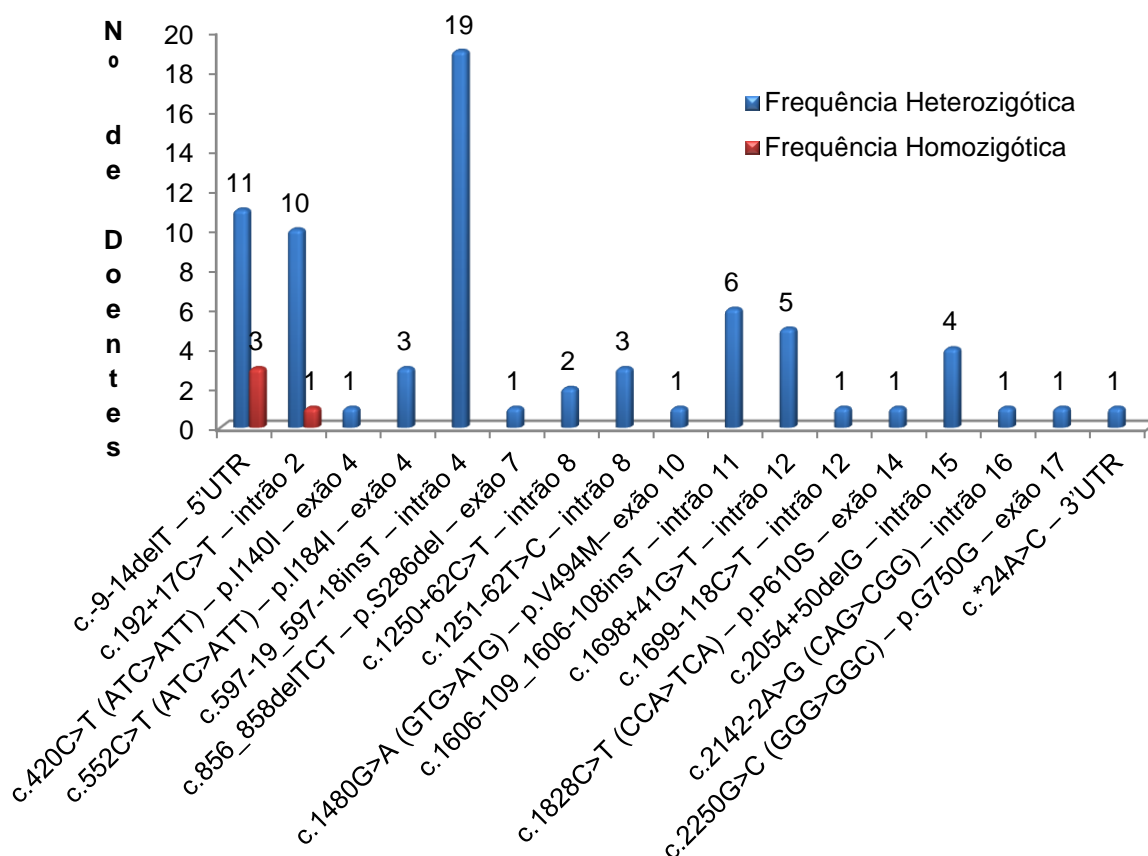


Figura 7- Frequência das variantes encontradas em heterozigotia e homozigotia nos 20 doentes estudados.

IV.2.1 Análise das variantes exónicas e respetivas regiões flanqueadoras do gene *LPIN1*

IV.2.1.1. Variante de *splicing* c.2142-2A>G

Esta variante ocorre na zona de *splicing* do exão 17 e segundo as base de dados de *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF3/>) e a *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org>) quebra o local aceitador, afetando assim o *splicing* da proteína, sendo provavelmente patogénica (Figura 8).

Esta alteração foi encontrada no doente 2 em heterozigotia, pelo que foi efetuada a sua pesquisa no DNA do descendente falecido, tendo sido encontrada em homozigotia.

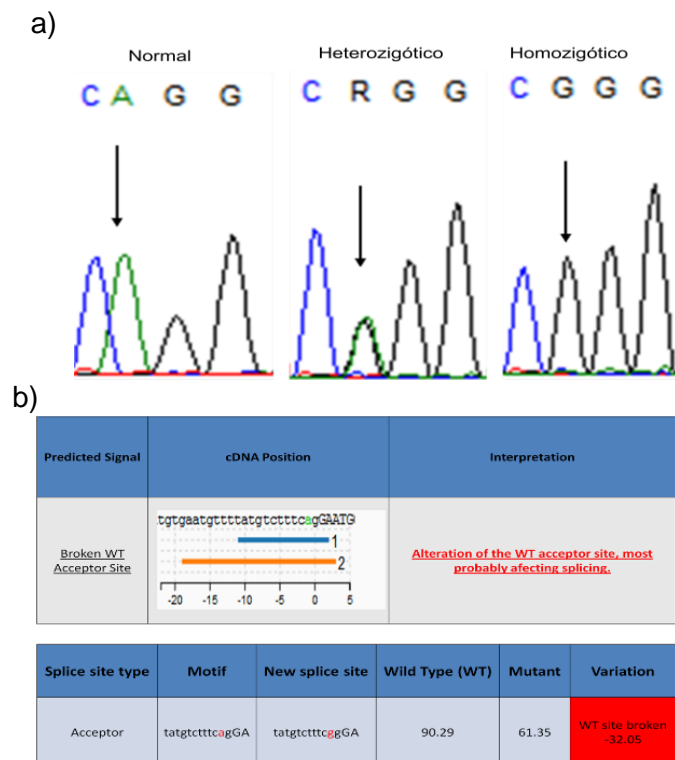


Figura 8 – Mutação de *splicing* c.2142-2A>G, a) sequências heterozigótica e homozigótica comparada com o controlo normal; b) Previsões de alteração de *splicing* feitas através das bases de dados mencionadas.

IV.2.1.2. Variantes não sinónimas

IV.2.1.2.1. Variante p.S286del

Esta alteração é a deleção de uma serina, num local repetitivo com 3 serinas e localizada na zona de *splicing* do exão 7 (Figura 9). Segundo a base de dados *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF3/>) altera o *splicing* proteico e através da base de dados *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>) para além de alterar o *splicing* proteico, esta variante apresenta critérios de patogenicidade, o que poderá ser explicado pelo facto de ser no início da proteína. A frequência deste *SNP* nos Europeus é nula.

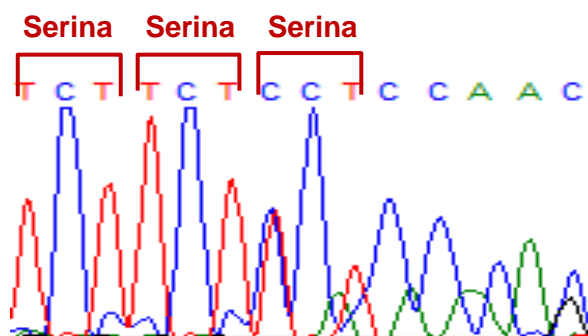


Figura 9 – Alteração c.856_858delTCT/ p.S286del em heterozigotia.

IV.2.1.2.2. Variante p.V494M

A variante c.1480G>A localiza-se no início do exão 10 e substitui uma valina por uma metionina na posição 494 da sequência proteica do gene *LPIN1* (Figura 10). Esta alteração é benigna a nível funcional pela base de dados do *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/>), no entanto pela base de dados *Sift* (<http://sift.jcvi.org/sift-bin/>) a troca de aminoácidos não é tolerada, isto pode ser explicado pelo facto de estes dois *softwares* poderem não usar o mesmo número de espécies de genes ortólogos. A base de dados de *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF3/>) indica-nos que esta alteração pode também causar alteração no *splicing* proteico. A nível estrutural esta alteração tem efeitos na proteína uma vez que a valina é mais leve e possui uma estrutura química mais simples que a metionina que é mais pesada e possui ainda um grupo sulfato (Figura 11). A frequência deste *SNP* nos Europeus é de 2%.

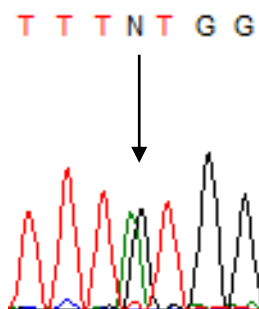


Figura 10 – Alteração c.1480G>A - p.V494M em heterozigotia.

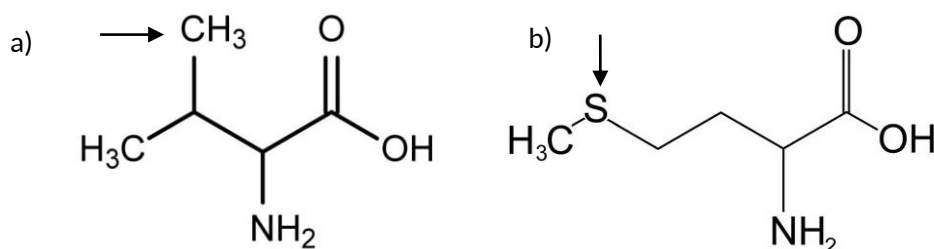


Figura 11- Estrutura química dos aminoácidos valina e metionina: a) aminoácido Valina; b) aminoácido Metionina.

IV.2.1.2.3 Variante p.P610S

A variante c.1828C>T ocorre no início do exão 14 e consiste na troca de uma prolina por uma serina na posição 610 da proteína da Lipin-1 (Figura 12). Esta alteração é benigna pela base de dados *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/>) e é corroborada pela *Sift* (<http://sift.jcvi.org/sift-bin/>) que indica que a troca de aminoácidos é tolerada. No entanto a base de dados *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF3/>) informa que a troca de aminoácidos pode influenciar o

splicing da proteína. A nível estrutural esta alteração poderá ter efeitos na proteína uma vez que a prolina é um aminoácido com a estrutura química mais rígida e coesa, enquanto a serina é um aminoácido mais simples (Figura 13). A frequência deste *SNP* nos Europeus é de 4%.

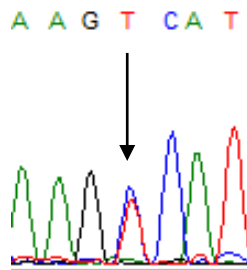


Figura 12 – Alteração c.1828C>T - p.P610S em heterozigotia.

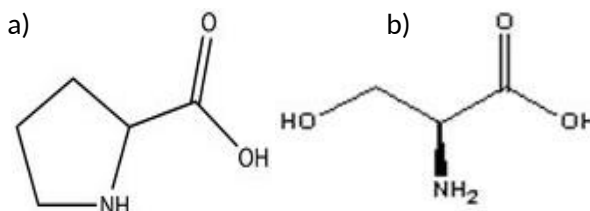


Figura 13 – Estrutura química dos aminoácidos prolina e serina: a) aminoácido Prolina; b) aminoácido Serina.

IV.2.1.3. Variantes sinónimas

IV.2.1.3.1. Variantes p.I140I, p.I184I e p.G750G

As variantes p.I140I (Figura 14) e p.I184I (Figura 15) encontram-se ambas no exão 4 no início e no fim, respetivamente, e são as duas silenciosas, pois não existe troca de aminoácidos. No entanto, segundo as bases de dados *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF3/>) e *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org>) estas duas alterações afetam o *splicing* proteico. A frequência, nos Europeus, do *SNP* p.I140I é nula e do p.I184I é de 14%.

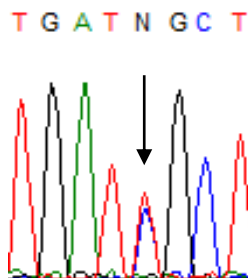


Figura 14 – Alteração c.420C>T - p.I140I em heterozigotia.

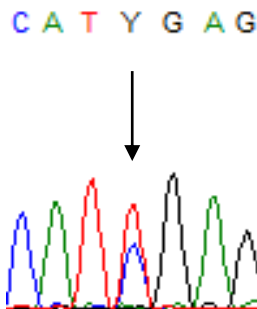


Figura 15 – Alteração c.552C>T - p.I184I em heterozigotia.

A variante p.G750G encontra-se no início do exão 17 e é silenciosa pois não existe troca de aminoácidos (Figura 16). Segundo as bases de dados *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF3/>) e *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org>) esta variante não causa nenhum efeito na proteína. A frequência deste *SNP* nos Europeus é nula.

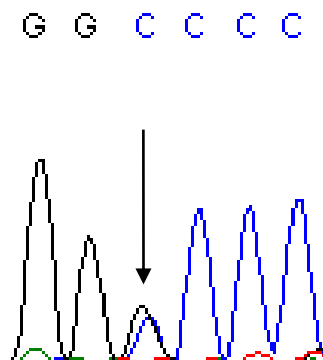


Figura 16 – Alteração c.2250G>C - p.G750G em heterozigotia.

V. Discussão

A RM associada a mutações no gene *LPIN1* apresenta transmissão autossómica recessiva, no entanto a base molecular desta patologia associada a mutações neste gene ainda não está bem esclarecida, uma vez que este gene desempenha várias funções em diferentes vias metabólicas, podendo levar a RM por vários mecanismos (isolados ou combinados) (Michot *et al*, 2010).

A lipin-1 possui dois homólogos, a lipin-2 e a lipin-3. Estas proteínas são codificadas por genes diferentes e localizam-se em cromossomas diferentes, no entanto partilham 44 a 48% de identidade global, forte homologia no domínio C-LIP e todas possuem atividade PAP1 (Michot *et al*, 2012).

Mutações no gene *LPIN2* estão associadas ao *Síndrome de Majeed*, uma vez que a ausência da atividade PAP1 neste gene origina inflamação da pele e dos ossos (Herlin *et al*, 2013). É possível que a lipin-2 compense a baixa atividade PAP1, resultante de alterações na lipin-1, o que explica a possibilidade de ambas poderem estar associadas a problemas inflamatórios, uma vez que a lipin-2 ao compensar a atividade PAP1 na produção energética e metabolismo lipídico pode originar sintomas inflamatórios, pois apenas compensa a atividade a níveis residuais (Michot *et al*, 2014). Os sintomas inflamatórios podem ser desencadeados por febre ou mesmo por um esforço intenso originando a produção de citocinas pelos músculos que podem levar a crises de RM (Hamel *et al*, 2015). Assim embora estas duas proteínas sejam expressas em tecidos diferentes e associadas também a sintomatologias diferentes, podem estar relacionadas através da diminuição da atividade enzimática PAP1, que por sua vez pode levar ao aparecimento de efeitos inflamatórios e consequentemente a crises de RM.

Com base no mestrado em genética forense poderíamos ter optado invés de usar a técnica de *Long-Range PCR* para a pesquisa da grande deleção descrita no *LPIN1*, usar *STRs* ou o *Real Time PCR*, uma vez que são técnicas com menos erros associados, no entanto a nível dos *STRs* precisaríamos de mais tempo para testar e otimizar os marcadores necessários e no caso do *Long-Range PCR* foi uma técnica que já estava descrita associada á pesquisa desta deleção.

Neste estudo apenas foi efetuado o estudo molecular do gene *LPIN1*, que permitiu aferir que algumas variantes identificadas em heterozigotia, poderão ser responsáveis pelo fenótipo apresentado por alguns doentes adultos. No caso do doente 1, foi identificada a variante p.P610S em heterozigotia, que apesar de estar descrita na base de dados como *SNP* (4%) poderá ser considerada uma mutação provavelmente patogénica como corroboram alguns recursos bioinformáticos utilizados. Como se trata

de uma criança que apresenta crises de RM recorrentes, assim como níveis de CK elevados durante as crises, seria interessante efetuar a pesquisa de grandes deleções, através do uso de RNA, neste gene, na tentativa de se encontrar o segundo alelo causal. O mesmo acontece com o doente 6 que possui a alteração p.V494M em heterozigotia associada a episódios recorrentes de RM. Esta variante está igualmente descrita nas bases de dados como *SNP* (2%). No entanto as previsões bioinformáticas indicam tratar-se de uma mutação provavelmente patogénica. Neste caso trata-se de um doente adulto, pelo que esta variante em heterozigotia pode ser responsável pelo fenótipo do doente.

As variantes identificadas nos doentes 12 (14 anos), 15 (16 anos), 19 (15 anos) e 20 (16 anos) são também de salientar pois embora sejam variantes sinónimas: a p.I140I presente no doente 12 e a p.I184I nos restantes, estas variantes alteram o *splicing* da proteína e embora se encontrem em heterozigotia, podem ser responsáveis pelos episódios recorrentes de RM e mialgias causadas pelo exercício apresentadas por estes doentes, jovens adultos. O doente 12 para além de apresentar a alteração sinónima p.I184I em heterozigotia, apresenta também a alteração p.S286del em heterozigotia, que para além de alterar o *splicing* proteico, apresenta critérios de patogenicidade segundo as previsões bioinformáticas. Todas as mutações referidas anteriormente necessitam de uma investigação mais aprofundada para concluir que são a causa da doença.

No doente 2 foi identificada uma mutação de *splicing* (c.2142-2A>G) em heterozigotia, não descrita na literatura, associada a sintomas de RM com mialgia, fraqueza muscular, fadiga e apneia do sono. No entanto a filha desta doente aos 2 anos começou a desenvolver uma clínica grave de RM com crises recorrentes e níveis de CK elevados durante estas crises. Esta criança faleceu aos 4 anos devido a uma crise de RM causada por uma gastroenterite, ficando a sua causa de morte por esclarecer. Como existia DNA disponível, extraído de biópsia muscular, utilizado para estudos da cadeia respiratória mitocondrial, foi pesquisada a mutação encontrada na mãe, tendo sido identificada a mesma mutação em homozigotia, confirmando a possível patogenicidade desta alteração de *splicing*.

Este estudo contribuiu para a identificação de uma nova mutação no gene *LPIN1*, permitindo esclarecer o diagnóstico molecular da criança falecida e da mãe, expandir o espetro mutacional deste gene e permitir um aconselhamento genético adequado a esta família.

A caracterização molecular destes doentes é importante uma vez que existe a possibilidade de um tratamento adequado e que é particularmente simples de administrar. Inicialmente é aplicada uma solução com 10% de glucose, 80mmol/L de

cloreto de sódio e 20mmol/L de cloreto de potássio, para uma elevada hidratação para permitir a estimulação da função diurética. Esta solução é muito concentrada em glucose para estabilizar o anabolismo o mais rápido possível, em seguida é necessário manter os doentes com uma ingestão bastante calórica em situações que possam levar ao catabolismo do organismo e em casos de anestesia devem ser sujeitos a uma infusão intravenosa de uma solução de glucose a 10% para evitar as crises de RM (Pichler *et al*, 2015).

VI. Conclusão

As mutações no gene *LPIN1* têm sido associadas à segunda causa mais comum de RM de início precoce, uma causa não reconhecida há dez anos atrás. As mutações heterozigóticas neste gene podem também apresentar sintomas de câimbras e mialgias induzidas pelo exercício ou outros sintomas musculares mais leves (Meijer *et al.*, 2015). Através deste estudo molecular foram identificadas algumas variantes provavelmente patogénicas quer por alteração de aminoácido quer por alteração do *splicing* da proteína. As variantes p.P610S e p.V494M, para além da alteração de aminoácido, que causam alterações na conformação da estrutura da proteína e alteram também o *splicing* proteico. As variantes silenciosas p.I140I e p.I184I, nas quais não ocorre troca de aminoácido localizam-se em locais conservados da proteína originando por isso alteração do *splicing* proteico. A variante c.2142-2A>G, altera o *splicing*, quebrando o local aceitador, o que pode levar a perda da região do domínio C-LIP (624 a 891a.a), sendo por este motivo provavelmente patogénica e causadora de doença.

Este estudo, para além de ser o primeiro estudo molecular do gene *LPIN1* associado à RM realizado em doentes portugueses, também contribuiu para esclarecer o diagnóstico definitivo numa família com apresentações clínicas diferentes associadas a uma nova mutação de *splicing* (c.2142-2A>G) (Nunes *et al.*, 2016). A implementação e investigação deste gene permitiu expandir o seu espetro mutacional e podendo a sua pesquisa ser incluída em todos os doentes (adultos e crianças) com clínica de RM

VII. Previsões Futuras

Futuramente seria importante estudar através do cDNA e/ou RNA , ou usando *STRs* ou *Real Time PCR*, grandes deleções no gene *LPIN1* para o doente 1, na esperança de encontrar o segundo alelo causal para os sintomas de RM e assim se poder concluir este caso.

Seria também interessante complementar o estudo do gene *LPIN1* com a investigação de genes que codificam proteínas que estão diretamente ligadas à lipin-1, quer a nível funcional quer a nível estrutural uma vez que os sintomas de RM podem muitas vezes ser causados por um mau funcionamento de duas proteínas em conjunto, devido à presença de mutações compostas (em genes relacionados). Assim, desta forma seria possível explicar o facto de doentes heterozigóticos para mutações no gene *LPIN1* possuírem uma clínica de RM. Seria interessante começar esta investigação através do estudo do gene Aldolase A (*ALDOA*) (associado a uma deficiência no mecanismo do glicogénio, a Glicogenose tipo XII), uma vez que as proteínas frutose-bifosfato aldolase A e lipin-1 estão interligadas por um factor nuclear (NFATc4) que ativa as células T, reprimindo a expressão genética inflamatória, motivo pelo qual mutações nestes dois genes podem influenciar esta função biológica.

Outro gene que deveria ser investigado nestes doentes é o fosfoglucomutase1 (*PGM1*). Este gene está também associado a uma deficiência no mecanismo do glicogénio, a Glicogenose tipo XIV, no entanto o motivo desta investigação seria pela apresentação clínica muito semelhante aos defeitos do metabolismo da Lipina, embora os sintomas apenas surjam entre a infância e adolescência.

Existem alterações de aminoácidos que interrompem a atividade PAP1 do gene *LPIN1*, embora estas nem sempre afetem a função de regulador nuclear de transcrição da proteína. Interrupções nesta atividade levam à não transformação do ácido fosfatídico em diacilglicerol, o que origina concentrações elevadas deste componente nas células. O aumento do ácido fosfatídico nas células poderá ser tóxico para estas, levando ao desenvolvimento de lesões musculares, miopatias e defeitos mitocondriais que poderão dar origem a RM recorrente (Schweitzer *et al*, 2015). Sendo assim seria também interessante o estudo molecular do gene *LPIN1* complementar com o estudo dos níveis de atividade da enzima PAP1 nas células do tecido muscular esquelético e adiposo, onde a lipin-1 é predominantemente expressa.

VIII. Referências Bibliográficas:

- ANTONS, Kenneth A. *et al.* (2006). “*Clinical Perspectives of Statin-Induced Rhabdomyolysis*”. The American Journal of Medicine:119(5):400-409.
 - BAGLEY, W.H. *et al.* (2007). “*Rhabdomyolysis*”. Intern Emerg Med 2:210-218.
 - CARUSO, Célia Sulzbacher. (2007). “*Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de Xyllela Fastidiosa*” - Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo. São Carlos: 2-64.
 - CARLOS, Carolina Sales *et al.* (2014). “*Glicogenoses: Uma revisão geral*”. Biosci.J., Uberlandia, 30(5):1598-1605
 - ESPREAFICO, Enilza Maria *et al.* (2003). “*Tecnologia do DNA do Recombinante*” - Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: 1-87.
 - GLYNE, P *et al.* (2002). “*Acute renal failure in practice*”. Imperial College Press. Chapter 12: 296-306
 - GRIMSEY, Neil *et al.* (2008). “*Temporal and Spatial Regulation of the Phosphatidate Phosphatases Lipin 1 and 2*”. The Journal of Biological Chemistry. 238(43):29166-29174.
 - HAMEL, Yamina *et al.* (2015). “*Acute rhabdomyolysis and inflammation*”. J Inherit Metab Dis 38:621-628.
 - HERLIN, Troels *et al.* (2013). “*Efficacy of anti-IL-1 treatment in Majeed Syndrome*”. Ann Rheum Dis. 72(3):410-413.
 - HERNANDEZ-OCHOA, Erick O. *et al.* (2016). “*Critical role of intracellular RyR1 calcium release channels in skeletal muscle function and disease*”. Frontiers in Physiology. 6(420):1-11.
 - JARADAT, Saied A. *et al.* (2016). “*Molecular analysis of LPIN1 in Jordanian patients with rhabdomyolysis*”. Meta Gene 7:90-94
 - KHAN, F. Y.. (2009). “*Rhabdomyolysis: a review of the literature*”. Netherlands Journal of Medicine; 67(9):272-283.
 - MEIJER, I.A. *et al.* (2015). “*LPIN1 deficiency with severe recurrent rhabdomyolysis and persistent elevation of creatine kinase levels due to chromosome 2 maternal isodisomy*”. Molecular Genetics and Metabolism Reports 5:85-88.
-

- MICHOT, Caroline, *et al.* (2014). “Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1 deficient myoblasts”. *Biochim Biophys Acta* 1832(12):2103-2114.
- MICHOT, Caroline, *et al.* (2012). “Study of *LPIN1*, *LPIN2* and *LPIN3* in rhabdomyolysis and exercise-induced myalgia”. *J Inherit Metab Dis* 38:621-628.
- MICHOT, Caroline, *et al.* (2010). “*LPIN1* Gene Mutations: A Major Cause of Severe Rhabdomyolysis in Early Childhood”. *HUMAN MUTATION Mutation in Brief* 31:1564-1573.
- NUNES, Diana, *et al.* (2016). “*LPIN1* deficiency: A novel mutation associated with different phenotypes in the same family”. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 9:29–30.
- PICHLER, Karin *et al.* (2015). “A novel therapeutic approach for *LPIN1* mutation -associated rhabdomyolysis – the Austrian experience”. *Muscle Nerve* 52:437-439.
- REUE, Karen *et al.* (2008). “Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism”. *Journal of Lipid Research* 49:2493-2503.
- ROSA, Nuno Guimarães *et al.* (2005). “Rabdomiólise”. *Acta Méd Port* 18:271-282.
- SCALCO, Renata Siciliani *et al.* (2015). “Rhabdomyolysis: a genetic perspective”. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 10:51.
- SCHWEITZER, George O. *et al.* (2015). “Rhabdomyolysis-Associated Mutations in Human *LPIN1* Lead to Loss of Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity”. *JIMD Reports*: 113-122.
- VIEIRA, Daniel Perez.”*Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reacções*” - Protozoologia - IMTSP/Laboratório de Biologia Molecular – IPEN: 1-11.
- ZEHARIA, Avraham *et al.* (2008). “Mutations in *LPIN1* Cause Recurrent Acute Myoglobinuria in Childhood”. *The American Journal of Human Genetics* 83: 489– 494.
- ZHANG, Peixiang *et al.* (2014). “*Lipin-1* Regulates Autophagy Clearance and Intersects with Statin Drug Effects in Skeletal Muscle”. *Cell Metabolism* 20: 267– 279.

VIII.1. Webgrafia:

- 1- <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/very-long-chain-acyl-coa-dehydrogenase-deficiency>

- 2- <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/carnitine-palmitoyltransferase-ii-deficiency#definition>
 - 3- [http://apostilas.cena.usp.br/Tsai/CEN-5734%20Ecologia%20Exp.%20Microorganismos/Aula%204/Desenho%20primers".pdf](http://apostilas.cena.usp.br/Tsai/CEN-5734%20Ecologia%20Exp.%20Microorganismos/Aula%204/Desenho%20primers)
-